

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 1109896

(43) Date of publication of application: 1994.1

(51) Int. Cl. C12N 15/09  
C07K 14/57, C12P 21/02  
// C12N 5/10, C12N 7/00  
(C12P 21/02, C12R 1:91), (C12N 5/10, C12R 1:91)

(21) Application number: 10216310  
(22) Date of filing: 30.07.1998  
(30) Priority: 01.08.1997 JP 09208087

(71) Applicant: TORAY IND INC  
(72) Inventor: OKANO FUMIYOSHI  
YAMADA MASANARI

### (54) PRODUCTION OF INTERFERON-GAMMA

#### (57) Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To efficiently obtain the subject compound useful for an antitumor agent, an antiviral agent, etc., by treating a recombinant Baculovirus containing interferon- $\gamma$  DNA in the extract of the body fluid of the larva of a silkworm infected with the recombinant Baculovirus under specific conditions.

**SOLUTION:** A recombinant Baculovirus contained in

the culture supernatant liquid of a cultured cell insect pest subjected to gene recombination DNA and an interferon- $\gamma$  protein or the body fluid of the larva of a silkworm infected with the recombinant Baculovirus is treated under acidic or alkaline conditions and inactivated to inexpensively and efficiently obtain a large amount of the objective interferon- $\gamma$  suitable for gene recombination useful as a medicine, an antitumor agent, an antiviral agent, etc. The clear polyhedrosis virus of a recombinant silkworm gene recombination with a DNA encoding interferon- $\gamma$  is preferably used as the recombinant Baculovirus.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-98997

(43) 公開日 平成11年(1999) 4月13日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 14/57		C 0 7 K 14/57	
C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02	F
// C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 7/00	
7/00		5/00	B
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 12 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平10-216310	(71) 出願人	000003159 東レ株式会社 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
(22) 出願日	平成10年(1998) 7月30日	(72) 発明者	岡野 文義 愛知県名古屋市港区大江町9番地の1 東 レ株式会社名古屋事業場内
(31) 優先権主張番号	特願平9-208087	(72) 発明者	山田 勝成 愛知県名古屋市港区大江町9番地の1 東 レ株式会社名古屋事業場内
(32) 優先日	平9(1997) 8月1日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 インターフェロナー $\gamma$ の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 遺伝子組換えインターフェロナー $\gamma$ の製造方法を提供する。

【解決手段】 インターフェロナー $\gamma$ 遺伝子組換えバキュロウイルスを酸またはアルカリ処理により不活化し、それにより失活したインターフェロナー $\gamma$ を中性、低温下で保存することにより活性型インターフェロナー $\gamma$ を製造する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 インターフェロナー $\gamma$ の蛋白質をコードするDNAにより遺伝子組換えされたバキュロウイルスを感染させた昆虫培養細胞の培養上清または該バキュロウイルスを感染させたカイコ幼虫の体液抽出液に含まれる組換えバキュロウイルスを酸性またはアルカリ性条件下で処理することにより不活化する工程を含むインターフェロナー $\gamma$ の製造方法。

【請求項2】 酸性条件下の処理に用いる酸が塩酸、硫酸、酢酸、リン酸および蟻酸から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする請求項1に記載のインターフェロナー $\gamma$ の製造方法。

【請求項3】 pHを3以下にすることを特徴とする請求項1または2に記載のインターフェロナー $\gamma$ の製造方法。

【請求項4】 生物学的活性を失ったインターフェロナー $\gamma$ を中性、低温下で処理することを特徴とするインターフェロナー $\gamma$ の製造方法。

【請求項5】 pH6～8で処理することを特徴とする請求項4に記載のインターフェロナー $\gamma$ の製造方法。

【請求項6】 15℃以下で処理することを特徴とする請求項4または5に記載のインターフェロナー $\gamma$ の製造方法。

【請求項7】 インターフェロナー $\gamma$ の蛋白質をコードするDNAにより遺伝子組換えされたバキュロウイルスを感染させた昆虫培養細胞の培養上清または該バキュロウイルスを感染させたカイコ幼虫の体液抽出液に含まれる組換えバキュロウイルスを酸性またはアルカリ性条件下で処理することにより活性を失ったインターフェロナー $\gamma$ であることを特徴とする請求項4から6のいずれか1項記載のインターフェロナー $\gamma$ の製造方法。

【請求項8】 遺伝子組換えバキュロウイルスが配列番号：24から配列番号：27のいずれかに記載のDNA配列により遺伝子組換えされた組換えカイコ核多角体病ウイルスであることを特徴とする請求項1から7のいずれか1項記載のインターフェロナー $\gamma$ の製造方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、有用蛋白質であり、抗腫瘍剤、抗ウイルス剤および抗アレルギー剤の候補であるインターフェロナー $\gamma$ を遺伝子組換え手法を用いて生産し、医薬品として製造する過程において、遺伝子組換え体の封じ込めおよび失活したインターフェロナー $\gamma$ の活性を回復させることによって、遺伝子組換えインターフェロナー $\gamma$ の効率的生産化を可能とし、以って大量かつ安価にインターフェロナー $\gamma$ を医薬品として製造する事を目的とした、インターフェロナー $\gamma$ の製造方法に関する。

**【0002】**

【従来の技術】遺伝子組換え手法を用いた有用蛋白質の

生産方法には多くの技術が知られており、例えば、遺伝子組換えしたバキュロウイルスを用いて有用蛋白質を大量に生産する方法がネコインターフェロン（文献1）等で報告されている。このような遺伝子組換え手法を用いて生産した有用蛋白質を医薬品として製造する場合、安全性の面から、遺伝子組換え体の封じ込め（不活化）を行う必要がある。例えば、遺伝子組換えしたバキュロウイルスを用いて有用蛋白質を生産する場合、細胞培養液もしくは昆虫体液中に多量の組換えウイルスが存在するため、組換えウイルスの不活化が必須である。バキュロウイルスの不活化方法に関しては文献2のように化学的あるいは物理的手法による種々の不活化方法が報告されており、また塩酸処理による遺伝子組換え体（遺伝子組換えカイコ核多角体病ウイルス）の不活化の例もネコインターフェロンの製造において報告されている（特開平4-207198）。有用蛋白質の生産の場合、組換えウイルスの不活化と同時に活性の維持が必要であるが、これまでの方法では有用蛋白質が失活する条件がほとんどである。インターフェロナー $\gamma$ は、化学的、物理的処理に極めて弱く、またpH安定性も極めて低いため、生産性の高いバキュロウイルス発現系を用いて医薬品として製造することは困難であった。

**【0003】**

【発明が解決しようとする課題】インターフェロナー $\gamma$ は熱処理、酸・アルカリ処理などあらゆる物理化学的処理により失活する極めて不安定な蛋白質である。そのため、インターフェロナー $\gamma$ を遺伝子組換え手法を用いて医薬品として製造する場合、その製造過程において失活することが非常に多く、製造方法がかなり限定される。

【0004】そこで、一度失活したインターフェロナー $\gamma$ の活性を回復させることが可能となれば、遺伝子組換えインターフェロナー $\gamma$ の製造が容易になり、幅広い生産方法で効率的にインターフェロナー $\gamma$ を医薬品として製造することが可能になることが期待される。

**【0005】**

【課題を解決するための手段】本発明者は、かかる状況に鑑み、遺伝子組換えインターフェロナー $\gamma$ の医薬品としての効率的製造を目的とし、創意工夫を成し、インターフェロナー $\gamma$ 遺伝子組換えバキュロウイルスを酸性あるいはアルカリ性下で処理することにより不活化し、それによって完全に生物学的活性を失ったインターフェロナー $\gamma$ を中性、低温下で保存することによって驚くべきことに活性が完全に回復することを見出し、以ってインターフェロナー $\gamma$ を効率的に大量に製造する方法を確立し、かくして本発明を完成させるに至った。

【0006】すなわち本発明は、インターフェロナー $\gamma$ 遺伝子組換えバキュロウイルスを酸またはアルカリ処理により不活化する方法と酸またはアルカリ処理により生物学的活性を失ったインターフェロナー $\gamma$ の活性を回復させる方法ならびにそうして得られたインターフェロン

ーアを提供するものである。

【0007】

【発明の実施の形態】以下、本発明に関し詳細に説明する。

【0008】本発明のインターフェロナーは全ての動物種を含むものとする。本発明の方法は、特にイヌインターフェロナーを製造する際に、好ましく用いられる。イヌインターフェロナーは糖鎖を結合したもの、糖鎖が存在しないもの、C末端構造が1部欠損したものなど、イヌインターフェロナーの活性を有するものは全て含まれる。

【0009】イヌインターフェロナーの蛋白をコードするDNAは例えば次のようにして製造することができる。すなわち、イヌの細胞からポリ(A)RNAを抽出した後、cDNAに転換し、イヌインターフェロナーをコードする遺伝子配列を元にしたプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応(以下PCRと略す)を行うことによってイヌインターフェロナーをコードする遺伝子を得ることができる。イヌの細胞、例えばマイトジェンなどで刺激されたイヌリンパ球などよりRNAを得る方法としては、通常の方法、例えば、ポリソームの分離、ショ糖密度勾配遠心や電気泳動を利用した方法などがあげられる。上記イヌ細胞よりRNAを抽出する方法としては、グアニジン・チオシアネート処理後CsCl密度勾配遠心を行うグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法(文献2)バナジウム複合体を用いてリボヌクレアーゼインヒビター存在下に界面活性剤で処理したのちフェノール抽出を行う方法(文献3)、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート・グアニジン塩酸法、グアニジン・チオシアネート・フェノール・クロロホルム法、グアニジン・チオシアネートで処理したのち塩化リチウムで処理してRNAを沈殿させる方法などの中から適当な方法を選んで行うことができる。

【0010】イヌリンパ球などより通常の方法、例えば、塩化リチウム/尿素法、グアニジン・イソチオシアネート法、オリゴdTセルロースカラム法等によりmRNAを単離し、得られたmRNAから通常の方法、例えば、Gublerらの方法(文献4)、H. Okayamaらの方法(文献5)等によりcDNAを合成する。得られたmRNAからcDNAを合成するには、基本的にはトリ骨芽球ウイルス(AMV)などの逆転写酵素などを用いるほか1部プライマーを用いてDNAポリメラーゼなどを用いる方法を組み合わせてよいが、市販の合成あるいはクローニング用キットを用いるのが便利である。このcDNAを鋳型としてイヌインターフェロナーの塩基配列を基にしたプライマーを用いてPCRを行うことによってイヌインターフェロナーの蛋白質をコードするDNAを得ることができる。

【0011】イヌインターフェロナーは、カイコに感

染する組換えカイコ核多角体病ウイルスを作製することによって、カイコ発現系を用いても生産することができる。組換えカイコ核多角体病ウイルスは、イヌインターフェロナーの蛋白質をコードするDNAをカイコのクローニングベクター(文献6)に連結して作製した組み換え体プラスミドとカイコ核多角体病ウイルスDNAとを、カイコ樹立細胞にコトランスフェクションして作製することができる。従って、組み換え体ウイルスは、*in vivo*的な方法で作製することができる。すなわち、イヌインターフェロナーの蛋白質をコードするDNA部分を、例えばpBM030(文献6)などのカイコのクローニングベクターの発現調節部分の下流に連結するという一般的な遺伝子操作に従って組換え体プラスミドを作製することができる。この組換え体プラスミドとカイコ核多角体病ウイルスDNA(文献6)とを、文献のような方法でカイコ樹立細胞、例えばBM-N株(文献6)にコトランスフェクションした後、培養を続け、培養液中に出現した非組換え体(野性型)と組換え体のウイルスの中から限界希釈法、もしくはブランク法などの一般的な方法によって組換え体ウイルスをクローニングすることができる。組換え体ウイルスは多角体の形成能がないことから、野性型ウイルスと容易に区別できる。イヌインターフェロナーの生産は、前記の組換えカイコ核多角体病ウイルスをカイコ樹立細胞中、またはカイコ生体中で増殖させることにより行なう。

【0012】カイコ樹立細胞を用いる場合は、前記組換え体ウイルスを含む培養液により、BM-N細胞を感染させ、平面培養または浮遊培養により培養する。BM-N細胞を培養する培地としては、例えば牛血清を添加したTC-10培地(文献7)やTC-100培地(日本農産工業(株)製)を使用することができる。培養温度は25~28℃が適当である。培養後、培養液を遠心分離しその上清からイヌインターフェロナーを回収する。

【0013】カイコ生体を用いる場合は、前記の組換え体ウイルスを含む培養液をカイコ幼虫に注射して、人工飼料を与えて飼育する。飼育後、体液を採取しその上清からイヌインターフェロナーを回収する。

【0014】イヌインターフェロナー遺伝子組換えバキュロウイルスの不活化に使用する酸またはアルカリとしては、塩酸、硫酸、酢酸、リン酸、蟻酸、水酸化ナトリウムなどが用いられるが、これらに限定されない。

【0015】使用される酸またはアルカリ溶液のpHはイヌインターフェロナー遺伝子組換えバキュロウイルスの不活化に十分な値であればよく、通常3以下または9以上が適当である。またこの方法は凍結点より高い温度で、好ましくは4~40℃で実施される。処理時間は少なくとも1分間であるが、それより長い処理も可能で、1~12時間処理することにより良好な結果が得られる。

【0016】処理により生物学的活性を失ったイヌインターフェロナーを中性、低温で処理することにより活性を向上させることができる。ここで中性とは、pH6～8で処理するのが好ましい。バキュウウイルスの不活化工程で酸性またはアルカリ性で処理をした液を中和後、遠心してその上清を0～15℃でインキュベートするのが好ましい。インキュベートの時間は少なくとも12時間以上が好ましく、さらに好ましくは1～7日間である。

【0017】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。

【0018】参考例1

<イヌインターフェロナー遺伝子組換えカイコ核多角体病ウイルスの作製(1)>

イヌcDNAの調製

イヌ末梢血よりリンパ球を分離し、フィトヘムアグルチニン(PHA)を50μg/mlの終濃度で48時間刺激した。刺激後、ISOGEN(ニッポンジーン(株)製)を用いて総RNAを調製した。得られたRNAを1mM EDTAを含む10mM トリス塩酸緩衝液(pH7.5)(以下TEと略する。)に溶解し、70℃で5分間処理した後、1M LiClを含むTEを同量加えた。0.5M LiClを含むTEで平衡化したオリゴdTセルロースカラムにRNA溶液をアプライし、同緩衝液にて洗浄した。さらに0.3M LiClを含むTEにて洗浄後、0.01% SDSを含む2mM EDTA(pH7.0)で吸着したポリ(A)RNAを溶出した。こうして得られたポリ(A)RNAを用いて一本鎖cDNAを合成した。すなわち、滅菌した0.5mlのマイクロ遠心チューブに5μgのポリ(A)RNAと0.5μgのオリゴdTプライマー(12-18mer)を入れ、ジエチルピロカルボネート処理滅菌水を加えて12μlにし、70℃で10分間インキュベートしたのち氷中に1分間つけた。これに200mM トリス塩酸(pH8.4), 500mM KCl溶液を2μl, 25mM MgCl<sub>2</sub>を2μl, 10mM dNTPを1μlおよび0.1M DTTを2μlそれぞれ加え、42℃で5分間インキュベートしたのち、200ユニットの逆転写酵素(GibcoBRL社製、SuperScriptII)を1μl加え、42℃でさらに50分間インキュベートしてcDNA合成反応を行った。さらに70℃で15分間インキュベートして反応を停止し、氷上に5分間置いた。この反応液に1μlのE. coli RNaseH(2units/ml)を加え、37℃で20分間インキュベートした。

【0019】(2)イヌインターフェロナー遺伝子の調製

イヌインターフェロナーの塩基配列(文献2)をもとに、5'-GCGAATTTCATGAATTATACAA

GCTATATCTTAGCT3'(配列番号1)と5'-GCGAATTCTTATTTTCGATGCTCTGCGGCCTCGAAA3'(配列番号2)の2種類の末端にEcoRI切断部位を付加したプライマーをDNAシンセサイザーにて合成した。(1)で得られたcDNAを0.5mlのマイクロ遠心チューブに2μlづつ取り、各プライマーを20pmol, 20mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 25mM KCl, 100μg/ml ゼラチン, 50μM 各dNTP, 4単位 ExTaq DNAポリメラーゼ(宝酒造(株)製)となるように各試薬を加え、全量100μlとする。DNAの変性条件を94℃, 1分、プライマーのアニーリング条件を55℃, 2分、プライマーの伸長条件を72℃, 3分の各条件でPerkin-Elmer Cetus社のDNAサーマルサイクラーを用い、30サイクル反応させた。これを1%アガロースゲルにて電気泳動し、約560bpのDNA断片を常法(文献8)に従って調製した。このDNA断片をInvitrogen社のT-Vectorに宝酒造(株)のDNA Ligation Kit Ver. 1を用いて16℃, 2時間反応を行い、連結した。これを用いて常法に従い大腸菌を形質転換し、得られた形質転換体よりプラスミドDNAを常法に従い調製した。次にこのプラスミドにPCR断片が挿入されていることを前述と同じ条件のPCRによって確認し、蛍光DNAシーケンサー(パーキンエルマー社製DNAシーケンサー373S)を用い、その添付プロトコールに従って、パーキンエルマー社のダイターミネーターサイクルシーケンシングキットを用いて、得られたDNA断片がイヌインターフェロナー DNAの塩基配列であることを確認した。

【0020】(3)カイコ発現用プラスミドの作製

ベクターpBM030(文献7)1μgを30ユニットの制限酵素EcoRIで37℃, 16時間消化した後、1ユニットのバクテリア由来アルカリホスファターゼ(宝酒造(株)製)で末端を脱リン酸化した。これを1%アガロースゲルにて電気泳動し、約11.3KbのDNA断片を常法に従い調製した。

【0021】DNA Ligation Kit Ver. 1を用いて、16℃, 16時間ライゲーション反応を行い、上記のように調製した、pBM030と(2)で調製したイヌインターフェロナーのDNA断片を連結した。これを用いて常法に従い大腸菌HB101を形質転換した。100μg/mlのアンプシリンを含むLBプレート上に生育するコロニーの中から、イヌインターフェロナーをコードするDNAの開始コドンから27bpまでを含むプライマー、すなわち、5'-ATGAATTATACAAGCTATATCTTAGCT3'(配列番号3)とpBM030のクローニングサイトEcoRIから下流の26bpのプライマー、すなわち、

5' ATCAACAACGCACAGAATCTAAC GCT3' (配列番号7)の2種類のプライマーを用いて、DNAの変性条件を94℃、1分、プライマーのアニーリング条件を55℃、2分、プライマーの伸長条件を72℃、3分の各条件でPerkin-Elmer Cetus社のDNAサーマルサイクラーを用い、30サイクルでPCRを行い、約650bpのDNA断片が得られた、イヌインターフェロナー $\gamma$ をコードするDNAがpBM030に正方向に組み込まれているプラスミドを得た。この組換え体プラスミドをpBM $\gamma$ とした。このプラスミドを含有する大腸菌をE. coli (pBM $\gamma$ )と名付けた。

【0022】また、イヌIFN- $\gamma$ の塩基配列をもとに、5' GCAGATCTATGAATTATACAA GCTATATCTTAGCT3' (配列番号: 8)と5' GCGAATTCTTATTTTCGATGCTCT GCGGCCTCGAAA3' (配列番号: 9)の2種類のプライマーを日本バイオサービス(株)に依頼し合成した。(1)で得られたcDNAを0.5mlのマイクロ遠心チューブに2 $\mu$ lづつ取り、各プライマーを20 pmol, 20mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、25mM KCl, 100  $\mu$ g/mlゼラチン、50 $\mu$ M各dNTP、4単位ExTaq DNAポリメラーゼ(宝酒造(株)製)となるように各試薬を加え、全量100 $\mu$ lとする。DNAの変性条件を94℃、1分、プライマーのアニーリング条件を55℃、2分、プライマーの伸長条件を72℃、3分の各条件でPerkin-Elmer Cetus社のDNAサーマルサイクラーを用い、30サイクル反応させた。これを1%アガロースゲルにて電気泳動し、517bpのDNA断片(配列番号: 10)を常法に従って調製した。このDNA断片をInvitrogen社のT-Vectorに宝酒造(株)に常法に従い連結した。これを用いて常法に従い大腸菌を形質転換し、得られた形質転換体よりプラスミドDNAを常法に従い調製した。次に蛍光DNAシーケンサー(パーキンエルマー社製DNAシーケンサー373S)を用い、その添付プロトコールに従って、パーキンエルマー社のダイナミーターサイクルシーケンシングキットを用いて、得られたDNA断片がイヌIFN- $\gamma$ をコードするDNAの塩基配列であることを確認した。

【0023】次にこのDNA断片を鋳型として3種類のプライマーの組合せ(配列番号: 11~16)で上記と同様の条件でPCRを行い、3種類のPCR増幅断片(配列番号: 17~19)を得た。これらを常法に従い回収し、配列番号: 17に示す断片を制限酵素BamHIおよびEcoRVで、配列番号: 18に示す断片を制限酵素HincIIおよびSnaBIで、配列番号: 19に示す断片を制限酵素EcoRVおよびEcoRIで、それぞれ切断後、制限酵素処理した配列番号:

17に示す断片と制限酵素処理した配列番号: 19に示す断片を混和してpUC19のEcoRI、BamHI部位へ常法に従い挿入し、組換えベクターを得た。さらにこのベクターを制限酵素EcoRVで切断後、配列番号: 18に示す断片を常法に従い挿入し組換えベクターを得、挿入されたDNAの塩基配列(配列番号: 20)を上記と同様にして確認した。その後、制限酵素BamHIおよびEcoRIで挿入されたDNAを回収し、これを制限酵素BglIIおよびEcoRIで切断したpBM030に常法に従い挿入して、カイコ発現用組換えベクターpBM $\gamma$ S2(-)を作製した。また、pBM $\gamma$ S2(-)を鋳型として配列番号: 21と配列番号: 22に示すプライマーを用いてPCRを行い、配列番号: 23に示すDNA断片を得、これを同様にして制限酵素処理後、pBM030のBglIIおよびEcoRI部位に挿入し、pBM $\gamma$ S2(-)/-20を作製した。

【0024】(4)イヌインターフェロナー $\gamma$ をコードするDNAで組換えられた組換えカイコ核多角体病ウイルスの作製

文献2の方法で組換えウイルスを作製した。すなわち、50mM HEPESバッファー(pH7.1)、0.28M NaCl、0.7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.7mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>からなる2.5mlの溶液に、2.5mlのDNA混合液(0.25M CaCl<sub>2</sub>、カイコ核多角体病ウイルスBmNPV T3株(文献2)のDNA10 $\mu$ g、組換え体プラスミドpBM $\gamma$ のDNA65 $\mu$ gを含む)を滴下し、生じた懸濁液0.5mlを5mlの10%FBSを添加したTC-10培地(文献2)中、25cm<sup>2</sup>のフラスコで平面培養した約3 $\times$ 10<sup>5</sup>個のBM-N細胞の培養基に加え、カイコ細胞にDNAを導入した。20時間後、新鮮な培地と交換し、さらに7日間培養後、培養液を回収した。その培養液を遠心して清澄化した上清を希釈して平面に培養したBM-N細胞の培養基に添加して8日間培養後、顕微鏡観察によりウイルス感染が見られ、かつ多角体が形成していない培養基を選択した(限界希釈法)。

【0025】限界希釈法を7回繰り返して、組換え体ウイルスをクローニングした。ここで作製したイヌインターフェロナー $\gamma$ およびイヌインターフェロナー $\gamma$ 変異体をコードするDNAを含む組換えウイルスをrBNV $\gamma$ 、rBNV $\gamma$ S2(-)およびrBNV $\gamma$ S2(-)/-20とした。

【0026】(5)組換え体ウイルス液の調製

75cm<sup>2</sup>のフラスコ底面で、15mlの10%FBSを含むTC-10培地中で平面培養した約3 $\times$ 10<sup>6</sup>個のBM-N細胞に、前記(4)でクローニングした組換え体ウイルスを含むBM-N細胞の培養液50 $\mu$ lをBM-N細胞に添加して、27℃で5日間培養後、培養液を3,000rpmで5分間遠心分離して、遠心上清を

組換え体ウイルス液として得た。ウイルス液を $10^{-7}$ 倍希釈し、その1mlをBM-N細胞の培養基に添加して27℃で7日間培養を続けると、顕微鏡観察によって培養基のBM-N細胞にウイルス感染が認められた。

#### 【0027】参考例2

<抗ウイルス活性測定法>ウイルスはVesicular Stomatitis Virus, 感受性細胞はイヌMDCK (ATCC CCL-34) を用い、文献11のCPE法に従って抗ウイルス活性を測定した。

#### 【0028】参考例3

<カイコ樹立細胞でのイヌインターフェロナーの生産>実施例1で得た組換え体ウイルス液を、0.5mlづつ、25cm<sup>2</sup>のフラスコで10%のFBSを含むTC-100培地中で平面培養した約 $3 \times 10^6$ 個のBM-N細胞に加えた。30分後、新鮮な5mlの10%FBSを含むTC-100培地と交換し、27℃で3日間培養した。培養液の遠心上清をとり、活性を調べた結果、 $10^4$ 希釈単位/mlの抗ウイルス活性が得られた。

#### 【0029】参考例4

<カイコ生体中でのイヌインターフェロナーの生産>5令2日目のカイコ幼虫に、実施例1で得た組換え体ウイルスのウイルス液を50μl/頭注射し、25℃で4日間、市販の人工飼料(カネボウシルクエレガンス社製)を与えて飼育後、10頭のカイコの腹部を切り、体液を氷冷したエッペンドルフチューブに採取し、遠心分離後の上清を得、0.22μmのフィルターでろ過滅菌後、活性を測定した結果、 $10^7$ 希釈単位/mlの抗ウイルス活性が得られた。

#### 【0030】参考例5

<細胞変性効果によるウイルス濃度の定量>文献12の方法に従って、イヌインターフェロナー遺伝子組換えウイルスの濃度を定量した。すなわち、組換えウイルスを感染させたカイコBM-N細胞の培養上清、またはカイコ幼虫体液抽出液を希釈し、 $5 \times 10^5$ 個のBM-N細胞培養液に添加した。27℃で10日間培養後、顕微鏡観察によってBM-N細胞に対する細胞変性効果を確認し、感染性ウイルス量を算定した。感染性ウイルス量は、文献13に従ってTCID<sub>50</sub>を求めることによって決定した。

#### 【0031】実施例1

<イヌインターフェロナー遺伝子組換えカイコ核多角体病ウイルスの不活化>実施例4で得られたカイコ体液を100mlの0.1N塩酸に浸漬し、4℃で6時間インキュベートした。得られた抽出液を2Nの水酸化ナトリウムでpH7にし、10,000gで30分間遠心後の上清を得た。この上清を用いて、組換えカイコ核多角体病ウイルスの量を調べた結果、組換えカイコ核多角体病ウイルスは完全に不活化していた。また、この上清の抗ウイルス活性を測定した結果、抗ウイルス活性は認められなかった。このことから、塩酸処理によりイヌイン

ターフェロナー組換えカイコ核多角体病ウイルスは不活化したが、それにより、イヌインターフェロナーの生物学的活性が失われたことが判明した。

#### 【0032】実施例2

<生物学的活性を失ったイヌインターフェロナーの活性の回復>実施例6で得られた上清をさらにpH7で4℃で1週間インキュベートした。インキュベート後、抗ウイルス活性を測定した結果、 $10^7$ 希釈単位/mlの抗ウイルス活性が得られた。これは、塩酸処理する前の活性とほぼ同等であり、イヌインターフェロナーの生物学的活性が完全に回復したことが示された。

#### 【0033】

【発明の効果】本発明によれば、遺伝子組換えインターフェロナーの効率的生産化ができ、以って大量かつ安価にインターフェロナーを医薬品として製造することが可能となる。

#### 【0034】参考文献

1. 桜井ら: J. Vet. Med. Sci., 54, 563 (1992).
2. Chirgwinら: Biochemistry, 18, 5294 (1979).
3. Bergerら: Biochemistry, 18, 5143 (1979).
4. Gublerら: Gene, 25, 236-269 (1983).
5. Okayamaら: Mol. Cell. Biol., 2, 161, (1982) & 3, 280, (1983).
6. T. Horiuchiら: Agric. Biol. Chem., 51, 1573-1580, (1987).
7. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 1982.

#### 【0035】

##### 【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 32

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

GAATTCATGAATTATACAAGCTATATCTTAGC

#### 【0036】配列番号: 2

配列の長さ: 35

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

GCGAATTCTTATTTTCGATGCTCTGCGGCCTCGAAA

【0037】配列番号：3

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGAATTATACAAGCTATATCTTAGCT

【0038】配列番号：4

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTTTCAGTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC

【0039】配列番号：5

配列の長さ：42

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCGACCATGGCTCAGGCCATGTTTTTAAAGAAATAGAAAAC

【0040】配列番号：6

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

配列

GCAGATCTAT GAATTATACA AGCTATATCT TAGCTTTTCA GCTTTCGCTG ATTTTGTGTT 60

CTTCTGGCTG TAACTGTCAG GCCATGTTTT TAAAGAAAT AGAAACCTA AAGGAATATT 120

TTCAGGCAAG TAATCCAGAT GTATCGGACG GTGGGTCTCT TTTCTAGAT ATTTTGAAGA 180

AATGGAGAGA GGAGAGTGAC AAAACAATCA TTCAGAGCCA AATTGTCTCT TTCTACTTGA 240

AACTGTTTGA CAACTTTAAA GATAACCAGA TCATTCAAAG GAGCATGGAT ACCATCAAGG 300

AAGACATGCT TGGCAAGTTC TTACAGTCAT CCACCAGTAA GAGGGAGGAC TTCCTTAAGC 360

TGATTCAAAT TCCTGTGAAC GATCTGCAGG TCCAGCGCAA GCGGATAAAT GAACTCATCA 420

AAGTGATGAA TGATCTCTCA CCAAGATCCA ACCTAAGGAA GCGGAAAAGG AGTCAGAATC 480

TGTTTCGAGG CCGCAGAGCA TCGAAATAAG AATTTCGC

【0045】配列番号：11

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATAGGATCCATGAATTATACAAGCTATATC

GGATCCTTATTTTCGATGCTCTGCGGCCTCGAAACAG

【0041】配列番号：7

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATCAACAACGCACAGAATCTAACGCT

【0042】配列番号：8

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCAGATCTATCAATTATACAAGCTATATCTTAGCT

【0043】配列番号：9

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGAATTCTTATTTTCGATGCTCTGCGGCCTCGAAA

【0044】配列番号：10

配列の長さ：517

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0046】配列番号：12

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTGGATATCTGGATTACTTGCTGAAAATATT



## 【0047】配列番号：13

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCATACGTATCGACGGTGGGTCTCTT

## 【0048】配列番号：14

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGTGGTGGTGTAAAGAACTGCCAAGCATGTCTTC

## 【0049】配列番号：15

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCGATATCCACCAGTAAGAGGGAGGACTTCCTTAAG

## 【0050】配列番号：16

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCGAATTCTTATTTGATGCTCTGCGGCCTCG

## 【0051】配列番号：17

配列の長さ：147

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATAGGATCCA TGAATTATAC AAGCTATATC TTAGCTTTTC AGCTTTGCGT GATTTTGTGT  
 TCTTCTGGCT GTAAGTGTCA GGCCATGTTT TTAAAGAAA TAGAAAACCT AAAGGAATAT  
 TTTCAGGCAA GTAATCCAGA TATCCAG

## 【0052】配列番号：18

配列の長さ：201

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCATACGTAT CGGACGGTGG GTCTCTTTTC GTAGATATTT TGAAGAAATG GAGAGAGGAG  
 AGTGACAAAA CAATCATTCA GAGCCAAATT GTCTCTTTCT ACTTGAAACT GTTTGACAAC  
 TTAAAGATA ACCAGATCAT TCAAAGGAGC ATGGATACCA TCAAGGAAGA CATGCTTGGC  
 AAGTTCTTAC AGTCGACCAC C

## 【0053】配列番号：19

配列の長さ：195

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

COGATATCCA CCAGTAAGAG GGAGGACTTC CTTAAGCTGA TTCAAATTC TGTGAACGAT  
 CTGCAGGTCC AGCGCAAGGC GATAAATGAA CTCATCAAAG TGATGAATGA TCTCTACCA  
 AGATCCAACC TAAGGAAGCG GAAAAGGAGT CAGAATCTGT TTCGAGGCCG CAGAGCATCG  
 AAATAAGAAT TCGAG

## 【0054】配列番号：20

配列の長さ：517

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCAGATCTAT GAATTATACA AGCTATATCT TAGCTTTTCA GCTTTGCGTG ATTTTGTGTT 60  
 CTTCTGGCTG TAACTGTCAG GCCATGTTTT TTAAAGAAAT AGAAAACCTA AAGGAATATT 120  
 TTAATGCAAG TAATCCAGAT GTATCGGACG GTGGGTCTCT TTTCTAGAT ATTTTGAAGA 180  
 AATGGAGAGA GGAGAGTGAC AAAACAATCA TTCAGAGCCA AATTGTCTCT TTCTACTTGA 240  
 AACTGTTTGA CAACTTTAAA GATAACCAGA TCATTCAAAG GAGCATGGAT ACCATCAAGG 300  
 AAGACATGCT TGGCAAGTTC TTAATAGCA GCACCAGTAA GAGGGAGGAC TTCCTTAAGC 360  
 TGATTCAAAT TCCTGTGAAC GATCTGCAGG TCCAGCGCAA GGCATAAAT GAACTCATCA 420

AAGTGATGAA TGATCTCTCA CCAAGATCCA ACCTAAGGAA GCGGAAAAGG AGTCAGAATC 480  
TGTTTCGAGG CCGCAGAGCA TCGAAATAAG AATTCGC

【0055】配列番号：21

配列の長さ：42

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGGAATCTTATCTTGGTGAGAGATCATTCACTTTGAT

【0056】配列番号：22

配列の長さ：42

配列の型：核酸

配列

GCAGATCTAT GAATTATACA AGCTATATCT TAGCTTTTCA GCTTTCGTG ATTTTGTGTT 60  
CTTCTGGCTG TAACTGTCAG GCCATGTTTT TAAAGAAAT AGAAACCTA AAGGAATATT 120  
TTCAGGCAAG TAATCCAGAT GTATCGGACG GTGGGTCTCT TTTCGTAGAT ATTTTGAAGA 180  
AATGGAGAGA GGAGAGTGAC AAAACAATCA TTCAGAGCCA AATTGTCTCT TTCTACTTGA 240  
AACTGTTTGA CAACTTTAAA GATAACCAGA TCATTCAAAG GAGCATGGAT ACCATCAAGG 300  
AAGACATGCT TGGCAAGTTC TTACAGTCAT CCACCAGTAA GAGGGAGGAC TTCCTTAAGC 360  
TGATTCAAAT TCCTGTGAAC GATCTGCAGG TCCAGCGCAA GCGATAAAT GAACTCATCA 420  
AAGTGATGAA TGATCTCTCA CCAAGATAAG AATTCGC

【0058】配列番号：24

配列の長さ：501

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：イヌ

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGGGATCCTTATCTTGGTGAGAGATCATTCACTTTGAT

【0057】配列番号：23

配列の長さ：457

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

配列の特徴

特徴を表わす記号：sig peptide

存在位置：1..72

特徴を決定した方法：S

特徴を表わす記号：mat peptide

存在位置：73..498

特徴を決定した方法：S

配列

ATG AAT TAT ACA AGC TAT ATC TTA GCT TTT CAG CTT TGC GTG ATT TTG 48  
Met Asn Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Val Ile Leu  
TGT TCT TCT GGC TGT AAC TGT CAG GCC ATG TTT TTT AAA GAA ATA GAA 96  
Cys Ser Ser Gly Cys Asn Cys Gln Ala Met Phe Phe Lys Glu Ile Glu  
AAC CTA AAG GAA TAT TTT CAG GCA AGT AAT CCA GAT GTA TCG GAC GGT 144  
Asn Leu Lys Glu Tyr Phe Gln Ala Ser Asn Pro Asp Val Ser Asp Gly  
GGG TCT CTT TTC GTA GAT ATT TTG AAG AAA TGG AGA GAG GAG AGT GAC 192  
Gly Ser Leu Phe Val Asp Ile Leu Lys Lys Trp Arg Glu Glu Ser Asp  
AAA ACA ATC ATT CAG AGC CAA ATT GTC TCT TTC TAC TTG AAA CTG TTT 240  
Lys Thr Ile Ile Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Leu Lys Leu Phe  
GAC AAC TTT AAA GAT AAC CAG ATC ATT CAA AGG AGC ATG GAT ACC ATC 288  
Asp Asn Phe Lys Asp Asn Gln Ile Ile Gln Arg Ser Met Asp Thr Ile  
AAG GAA GAC ATG CTT GGC AAG TTC TTA CAG TCA TCC ACC AGT AAG AGG 336  
Lys Glu Asp Met Leu Gly Lys Phe Leu Gln Ser Ser Thr Ser Lys Arg  
GAG GAC TTC CTT AAG CTG ATT CAA ATT CCT GTG AAC GAT CTG CAG GTC 384  
Glu Asp Phe Leu Lys Leu Ile Gln Ile Pro Val Asn Asp Leu Gln Val  
CAG CGC AAG GCG ATA AAT GAA CTC ATC AAA GTG ATG AAT GAT CTC TCA 432  
Gln Arg Lys Ala Ile Asn Glu Leu Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Ser  
CCA AGA TCC AAC CTA AGG AAG CGG AAA AGG AGT CAG AAT CTG TTT CGA 480

Pro Arg Ser Asn Leu Arg Lys Arg Lys Arg Ser Gln Asn Leu Phe Arg  
 GGC CGC AGA GCA TCG AAA TAA 501  
 Gly Arg Arg Ala Ser Lys \*\*\*

## 【0059】配列番号: 25

配列の長さ: 441

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

生物名: イヌ

配列の特徴

特徴を表わす記号: sig peptide

存在位置: 1..72

特徴を決定した方法: S

特徴を表わす記号: mat peptide

存在位置: 73..438

特徴を決定した方法: S

## 配列

ATG AAT TAT ACA AGC TAT ATC TTA GCT TTT CAG CTT TGC GTG ATT TTG 48  
 Met Asn Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Val Ile Leu  
 TGT TCT TCT GGC TGT AAC TGT CAG GCC ATG TTT TTT AAA GAA ATA GAA 96  
 Cys Ser Ser Gly Cys Asn Cys Gln Ala Met Phe Phe Lys Glu Ile Glu  
 AAC CTA AAG GAA TAT TTT CAG GCA AGT AAT CCA GAT GTA TCG GAC GGT 144  
 Asn Leu Lys Glu Tyr Phe Gln Ala Ser Asn Pro Asp Val Ser Asp Gly  
 GGG TCT CTT TTC GTA GAT ATT TTG AAG AAA TGG AGA GAG GAG AGT GAC 192  
 Gly Ser Leu Phe Val Asp Ile Leu Lys Lys Trp Arg Glu Glu Ser Asp  
 AAA ACA ATC ATT CAG AGC CAA ATT GTC TCT TTC TAC TTG AAA CTG TTT 240  
 Lys Thr Ile Ile Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Leu Lys Leu Phe  
 GAC AAC TTT AAA GAT AAC CAG ATC ATT CAA AGG AGC ATG GAT ACC ATC 288  
 Asp Asn Phe Lys Asp Asn Gln Ile Ile Gln Arg Ser Met Asp Thr Ile  
 AAG GAA GAC ATG CTT GGC AAG TTC TTA CAG TCA TCC ACC AGT AAG AGG 336  
 Lys Glu Asp Met Leu Gly Lys Phe Leu Gln Ser Ser Thr Ser Lys Arg  
 GAG GAC TTC CTT AAG CTG ATT CAA ATT CCT GTG AAC GAT CTG CAG GTC 384  
 Glu Asp Phe Leu Lys Leu Ile Gln Ile Pro Val Asn Asp Leu Gln Val  
 CAG GCG AAG GCG ATA AAT GAA CTC ATC AAA GTG ATG AAT GAT CTC TCA 432  
 Gln Arg Lys Ala Ile Asn Glu Leu Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Ser  
 CCA AGA TAA 441  
 Pro Arg \*\*\*

## 【0060】配列番号: 26

配列の長さ: 453

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

生物名: イヌ

配列の特徴

特徴を表わす記号: sig peptide

存在位置: 1..72

特徴を決定した方法: S

特徴を表わす記号: mat peptide

存在位置: 73..450

特徴を決定した方法: S

## 配列

ATG AAT TAT ACA AGC TAT ATC TTA GCT TTT CAG CTT TGC GTG ATT TTG 48  
 Met Asn Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Val Ile Leu  
 TGT TCT TCT GGC TGT AAC TGT CAG GCC ATG TTT TTT AAA GAA ATA GAA 96  
 Cys Ser Ser Gly Cys Asn Cys Gln Ala Met Phe Phe Lys Glu Ile Glu  
 AAC CTA AAG GAA TAT TTT CAG GCA AGT AAT CCA GAT GTA TCG GAC GGT 144  
 Asn Leu Lys Glu Tyr Phe Gln Ala Ser Asn Pro Asp Val Ser Asp Gly  
 GGG TCT CTT TTC GTA GAT ATT TTG AAG AAA TGG AGA GAG GAG AGT GAC 192  
 Gly Ser Leu Phe Val Asp Ile Leu Lys Lys Trp Arg Glu Glu Ser Asp  
 AAA ACA ATC ATT CAG AGC CAA ATT GTC TCT TTC TAC TTG AAA CTG TTT 240

Lys Thr Ile Ile Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Leu Lys Leu Phe  
 GAC AAC TTT AAA GAT AAC CAG ATC ATT CAA AGG AGC ATG GAT ACC ATC 288  
 Asp Asn Phe Lys Asp Asn Gln Ile Ile Gln Arg Ser Met Asp Thr Ile  
 AAG GAA GAC ATG CTT GGC AAG TTC TTA CAG TCA TCC ACC AGT AAG AGG 336  
 Lys Glu Asp Met Leu Gly Lys Phe Leu Gln Ser Ser Thr Ser Lys Arg  
 GAG GAC TTC CTT AAG CTG ATT CAA ATT CCT GTG AAC GAT CTG CAG GTC 384  
 Glu Asp Phe Leu Lys Leu Ile Gln Ile Pro Val Asn Asp Leu Gln Val  
 CAG CGC AAG GCG ATA AAT GAA CTC ATC AAA GTG ATG AAT GAT CTC TCA 432  
 Gln Arg Lys Ala Ile Asn Glu Leu Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Ser  
 CCA AGA TCC AAC CTA AGG TAA 453  
 Pro Arg Ser Asn Leu Arg \*\*\*

【0061】配列番号: 27

配列の長さ: 501

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

生物名: イヌ

配列の特徴

配列の特徴

特徴を表わす記号: sig peptide

存在位置: 1..72

特徴を決定した方法: S

特徴を表わす記号: mat peptide

存在位置: 73..498

特徴を決定した方法: S

配列

ATG AAT TAT ACA AGC TAT ATC TTA GCT TTT CAG CTT TGC GTG ATT TTG 48  
 Met Asn Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Val Ile Leu  
 TGT TCT TCT GGC TGT AAC TGT CAG GCC ATG TTT TTT AAA GAA ATA GAA 96  
 Cys Ser Ser Gly Cys Asn Cys Gln Ala Met Phe Phe Lys Glu Ile Glu  
 AAC CTA AAG GAA TAT TTT AAT GCA AGT AAT CCA GAT GTA TCG GAC GGT 144  
 Asn Leu Lys Glu Tyr Phe Asn Ala Ser Asn Pro Asp Val Ser Asp Gly  
 GGG TCT CTT TTC GTA GAT ATT TTG AAG AAA TGG AGA GAG GAG AGT GAC 192  
 Gly Ser Leu Phe Val Asp Ile Leu Lys Lys Trp Arg Glu Glu Ser Asp  
 AAA ACA ATC ATT CAG AGC CAA ATT GTC TCT TTC TAC TTG AAA CTG TTT 240  
 Lys Thr Ile Ile Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Leu Lys Leu Phe  
 GAC AAC TTT AAA GAT AAC CAG ATC ATT CAA AGG AGC ATG GAT ACC ATC 288  
 Asp Asn Phe Lys Asp Asn Gln Ile Ile Gln Arg Ser Met Asp Thr Ile  
 AAG GAA GAC ATG CTT GGC AAG TTC TTA AAT AGC AGC ACC AGT AAG AGG 336  
 Lys Glu Asp Met Leu Gly Lys Phe Leu Asn Ser Ser Thr Ser Lys Arg  
 GAG GAC TTC CTT AAG CTG ATT CAA ATT CCT GTG AAC GAT CTG CAG GTC 384  
 Glu Asp Phe Leu Lys Leu Ile Gln Ile Pro Val Asn Asp Leu Gln Val  
 CAG CGC AAG GCG ATA AAT GAA CTC ATC AAA GTG ATG AAT GAT CTC TCA 432  
 Gln Arg Lys Ala Ile Asn Glu Leu Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Ser  
 CCA AGA TCC AAC CTA AGG AAG CGG AAA AGG AGT CAG AAT CTG TTT CGA 480  
 Pro Arg Ser Asn Leu Arg Lys Arg Lys Arg Ser Gln Asn Leu Phe Arg  
 GGC CGC AGA GCA TCG AAA TAA 501  
 Gly Arg Arg Ala Ser Lys \*\*\*

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>8</sup>

識別記号

F I

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 N 5/10

(12)

特開平11-98997

C12R 1:91)